



University of Groningen

## Een snelle, kwantitatieve micro-bepaling van de gevoeligheid van bacteriën voor antibiotica en chemotherapeutica

Koopmans, Rinze Kornelis

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
1959

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Koopmans, R. K. (1959). Een snelle, kwantitatieve micro-bepaling van de gevoeligheid van bacteriën voor antibiotica en chemotherapeutica. Groningen: s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## SAMENVATTING EN RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK.

In het literatuuroverzicht zijn de verschillende methoden besproken die gebruikt worden voor het bepalen van de gevoeligheid van bacteriën voor antibiotica en chemotherapeutica, waarbij de foutenbronnen, alsmede de vóór- en nadelen van de verdunningsmethoden en de diffusiemethoden zijn aangegeven.

Het bleek dat de meningen over de waarde van de resultaten verkregen met deze methoden uiteenlopen. Zelfs het vergelijken van de resultaten van bepalingen met dezelfde methode, verricht in verschillende laboratoria, is bezwaarlijk doordat de uitvoering varieert; vaak wordt bijvoorbeeld geënt met inocula van verschillende grootte. Enkele nieuwe verdunningsmethoden en diffusiemethoden zijn genoemd.

Geen van de methoden is algemeen aanvaard.

Uit het overzicht blijkt, dat een methode die wel voor algemene toepassing in aanmerking zou kunnen komen, aan de volgende voorwaarden moet voldoen:

- 1) Het uitvoeren van een bepaling mag slechts weinig tijd kosten, met gering materiaal verbruik.
- 2) De resultaten moeten kwantitatief zijn.
- 3) De resultaten moeten vooral snel bekend zijn.
- 4) Een direkte enting met pathologisch materiaal moet tot de mogelijkheden behoren, wat tevens inhoudt dat:
- 5) De invloed van de inoculum-grootte van geen belang mag zijn.

Hoofdstuk I is gewijd aan een theoretische uiteenzetting over- en de technische ontwikkeling van een nieuwe methode.

Op een vaste, heldere voedingsbodem kan men, zoals bekend, geënte bacteriën microscopisch waarnemen en hun groei vervolgen. Uit het onderzoek bleek, dat na 3 à 4 uur incubatie een remming van deze initiale groei door een antibioticum is te zien en dat die groeiremming kwantitatief is uit te drukken.

Hiervoor werden de begrippen "begintelling", "groepjestelling" en "eindtelling" ingevoerd. Onder begintelling werd verstaan, het gemiddelde aantal bacteriën dat bij gespreide enting, samen uitgroeit tot een microkolonie. Met de groepjestelling werd het gemiddelde aantal bacteriën aangegeven, dat na een bepaalde incubatietijd aan-

wezig is in microkolonie's, die onder invloed van de werking van een antibioticum niet volledig zijn uitgegroeid. Onder eindtelling werd verstaan het gemiddelde aantal bacteriën waaruit een microkolonie na een bepaalde incubatietijd bestaat bij normale, niet door antibiotica geremde groei.

Er was een reproduceerbare verhouding aan te tonen tussen de groepjestelling van een bacteriestam en de antibioticum-concentratie in de voedingsbodem. Daardoor was in principe een kwantitatieve micro-bepaling mogelijk, als voor een antibioticum en een bacteriesoort kon worden vastgesteld, welke grootte van de groepjestelling de gevoeligheid van de bacteriesoort voor het antibioticum weergeeft. Hiervoor is eerst de invloed van verschillende factoren op de groepjestelling nagegaan. (Hoofdstuk II). Daarna zijn de groepjestellingen vergeleken met de resultaten van een geschikte verdunningsmethode. (Hoofdstuk III en IV).

Aanvankelijk werd uitgegaan van de oorspronkelijk door Fortner (1930) aangegeven dekglastechniek. Deze wijze van werken was bij uitbreiding van het onderzoek echter te omslachtig. Een oplossing werd gevonden door gebruik te maken van objectglazen met gekitte glasrandjes. De aldus omrande ruimte werd gevuld met een geringe hoeveelheid van een vaste voedingsbodem. Dit laagje voedingsbodem werd een "huidje" genoemd. De plaats van enting werd aangegeven met genummerde, ingekraste strepen, zodat op elk "huidje" 20 verschillende cultures konden worden geënt.

Het enten geschiedde steeds met een paardehaar, dit was het enige materiaal dat nooit beschadiging van de voedingsbodem gaf.

De glaasjes met voedingsbodem werden bewaard in gesloten metalen dozen. Een nader onderzoek wees uit, dat wanneer de dozen bij 40°C. werden bewaard, het gewichtsverlies door verdamping van de voedingsbodem praktisch te verwaarlozen is.

Het onderzoek in Hoofdstuk II had ten doel om na te gaan, welke factoren invloed op de groepjestellingen uitoefenen.

a) Invloed van het aantal getelde groepjes op de groepjestelling.

Om een betrouwbaar gemiddelde te krijgen als waarde voor

de groepjestelling mag het aantal te tellen groepjes niet te klein zijn, een groot aantal te tellen groepjes daarentegen zou de bepalingen zeer tijdrovend maken.

Er werd een onderzoek uitgevoerd met een aantal *St. aureus*-stammen waaruit bleek, dat bij het tellen van 20 groepjes een significant verschil bestond tussen de groepjestellingen, wanneer de concentratie's van de antibiotica in de voedingsbodems toenamen volgens de reeks 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 enz.

Bij het tellen van 10 groepjes was dit niet het geval. Omdat bij het tellen van 20 groepjes een redelijk aantal bepalingen per dag mogelijk was, werd voor de groepjestelling steeds het gemiddelde van 20 getelde groepjes bepaald.

b) Invloed van de grootte van het inoculum op de groepjestelling.

Bepalingen bleken uitvoerbaar wanneer geënt werd uit suspensie's met  $10^5$  -  $10^{10}$  bact/ml. Met kleinere inocula worden onvoldoende bacteriën geënt om groepjestellingen uit te kunnen voeren en bij grotere inocula liggen de bacteriën zo dicht naast elkaar, dat het tellen van afzonderlijke groepjes onmogelijk is.

Een nader onderzoek over de invloed van de inoculum-grootte binnen de genoemde grenzen had als belangrijk resultaat, dat geen invloed kon worden aangetoond. Deze bevinding gaf aanleiding tot een bespreking van de 4 factoren, waarop de invloed van de inoculum-grootte op de resultaten van bepalingen met een verdunningsmethode berust (zie blz. 28). Er werd vastgesteld dat geen van deze factoren invloed op de groepjestelling kan uitoefenen.

c) Invloed van de incubatieduur.

Deze invloed bleek het grootst te zijn bij concentratie's waar de bacteriegroei relatief weinig is geremd. De invloed was geringer bij de antibiotica penicilline en streptomycine dan bij chlooramfenicol, tetracycline en erytromycine. Om in hoofdstuk IV nader genoemde redenen, werd een incubatieduur van 4 uur gekozen.

d) Dikte van de huidjes.

De invloed hiervan op de groepjestelling was alleen aan te tonen, wanneer de voedingsbodem dunner was dan 0,5 mm.

e) Invloed van de voedingsbodem.

Dit onderzoek had tot resultaat dat de voedingsbodem

volgens Harper en Cawston (1945) één van de meest geschikte bleek; later werd het gehalte aan gehaemolyseerde paarde-erythrocyten verminderd tot 2%.

f) Invloed van de ouderdom van geënte cultures.

Deze invloed werd nagegaan met enkele *St. aureus*-stammen. Cultures hiervan op vaste voedingsbodems konden 2 dagen bij kamertemperatuur blijven staan, alvorens uit de eindtelling bleek, dat een cultuur voor een bepaling te oud was geworden.

g) Invloed van het bewaren van de huidjes.

Huidjes met concentratie's van verschillende antibiotica konden 21 dagen bij koelkasttemperatuur worden bewaard, voordat de groepjestellingen aanzienlijk gingen veranderen.

In Hoofdstuk III werd nagegaan welke uitvoering van een der gebruikelijke verdunningsmethoden het meest geschikt zou zijn om als vergelijkings-methode voor de groepjestellingen te dienen.

Daar de grootte van het inoculum een belangrijke invloed kan uitoefenen op de resultaten van verdunningsmethoden, werd hiernaar een onderzoek ingesteld, met vaste en vloeibare voedingsbodems.

Op grond van literatuurstudie en eigen onderzoek werd geconcludeerd, dat de beste resultaten mogen worden verwacht van bepalingen, uitgevoerd op vaste voedingsmedia, geënt met een klein inoculum.

Weer bleek een bouillon-agar bodem met 5% gehaemolyseerde paarde-erythrocyten goed te voldoen.

Hoofdstuk IV is gewijd aan een vergelijkend onderzoek met een groot aantal stammen van verschillende bacteriesoorten.

De gevoeligheid werd steeds bepaald met de vergelijkingsmethode als standaard. De resultaten hiervan vormden het uitgangspunt voor een vergelijking met groepjestellingen, van dezelfde bacteriestammen, geënt op dezelfde concentratiereeksen. De concentratie's waarvoor de stammen volgens de standaard-methode gevoelig waren, werden aangeduid met de letter C. De overige concentratie's in de verdunningsreeksen konden nu worden uitgedrukt in delen van C.

Groepjestellingen van verschillende stammen van dezelfde bacteriesoort, die gevonden waren bij een bepaald antibio-

ticum, bij dezelfde waarde van C, werden opgeteld en het gemiddelde berekend. De op deze wijze ontstane betrekking, tussen waarden van C en de hierbij behorende gemiddelde groepjestellingen, kon worden weergegeven in een grafiek. Hiervoor werden op dubbellogaritmisch papier de waarden van C langs de abscis uitgezet en de groepjestellingen als ordinaten. Er ontstond dan steeds een rechte lijn (G) die dus voor een bacteriesoort het verband weergeeft tussen groepjestelling en gevoeligheid volgens de standaard-methode bij een bepaald antibioticum. De constructie van deze lijnen maakte het mogelijk om door middel van een groepjestelling de gevoeligheid van de onderzochte stam te bepalen.

Er werden vervolgens 20 groepjestellingen uitgevoerd met dezelfde stam op dezelfde huidjes. Door van deze groepjestellingen het gemiddelde en de standaardvariatie te berekenen was de spreiding van de tellingen bij een bepaalde antibioticum-concentratie bekend en daarmee tevens de reproduceerbaarheid van de bepalingen onder optimale omstandigheden. (zie de lijnen O en O<sup>1</sup>).

Een soortgelijk onderzoek werd uitgevoerd met enkele bacteriestammen waarbij ouderdom en afkomst van de cultures varieerde. De stammen werden geënt op huidjes die op verschillende tijdstippen waren gemaakt. De groepjestellingen werden in een tijdsverloop van 2 weken verricht.

Op deze wijze werden de omstandigheden nagebootst zoals men ze in de praktijk mag verwachten. Met de verkregen gegevens werd de reproduceerbaarheid van de resultaten onder normale omstandigheden vastgelegd. (zie de lijnen R en R<sup>1</sup>).

De verhouding tussen groepjestellingen en de gevoeligheid kon bij *St. aureus*-stammen die ongevoelig waren voor 0,1 E/ml penicilline, niet worden weergegeven volgens een lijn G. Hetzelfde bleek te gelden voor alle bepalingen met sulfonamiden en bij *E. coli*-stammen voor nitrofurantoïne.

Door vergelijking van de resultaten van de standaard-methode met de groeiremming na 4 à 5 uur incubatie op de huidjes, was het uitvoeren van bepalingen met de micro-methode wel mogelijk. Doch hierbij heeft men niet het voordeel, zoals bij de andere bepalingen, dat met slechts enkele concentratie's de gevoeligheid in een groot gebied nauwkeurig kan worden bepaald.

De gevoeligheid van *St. aureus*-stammen, die minder ge-

voelig waren voor erytromycine, kon niet na deze korte incubatie worden bepaald.

Als slot van het hoofdstuk werden de resultaten van het onderzoek besproken. Er werd geconcludeerd, dat in het algemeen de resultaten van bepalingen met de micro-methode reproduceerbaar zijn tussen + en - 30% van de gevonden concentratie's, terwijl volgens literaturopgaven de reproduceerbaarheid van de gebruikelijke verdunningsmethoden ligt tussen + 100% en - 50% van de gevonden resultaten.

In Hoofdstuk V zijn de ervaringen medegedeeld, die verkregen werden na het invoeren van de micro-methode in het routinelaboratorium.

De begrippen "zeer gevoelig" tot en met "ongevoelig" werden voor de verschillende antibiotica, aan de hand van literatuurgegevens, besproken. Er werd op gewezen, dat deze indeling eigenlijk alleen tot stand kan komen, op grond van vergelijkend klinisch-bacteriologisch onderzoek.

Tenslotte volgde een vergelijking tussen de resultaten, van gedurende een half jaar verrichte bepalingen met de micro-methode en die van een vroeger in het laboratorium toegepaste diffusiemethode. Het bleek, dat het resultaat van gevoeligheidsbepalingen 2 à 3 x zo snel bekend was na het invoeren van de micro-methode. In het algemeen waren de ervaringen met de nieuwe methode zeer bevredigend. De methode voldeed aan alle in het begin van deze samenvatting genoemde voorwaarden.

De toepassing ervan zal voor geen enkel routinelaboratorium bezwaarlijk kunnen zijn en zal in vele gevallen een door gevoeligheidsbepalingen geleide antibacteriële therapie tot werkelijkheid kunnen maken.

Het onderzoek heeft geleid tot de ontwikkeling van een nieuwe methode voor het bepalen van de gevoeligheid van pathogene bacteriën voor de gebruikelijke antibiotica en chemotherapeutica.

De bepalingen worden uitgevoerd met behulp van objectglazen waarop dunne laagjes van heldere, vaste voedingsbodems met verschillende antibioticum-concentratie's zijn aangebracht. Op ieder glaasje kunnen 20 verschillende cultures worden geënt.

Het aflezen van de bepalingen geschiedt microscopisch na 4 à 5 uur incubatie bij 37°C.

De methode geeft nauwkeurige, kwantitatieve resultaten, die praktisch onafhankelijk zijn van de grootte van het inoculum. Het uitvoeren van de bepalingen is weinig tijdrovend, terwijl het materiaalverbruik gering is. In het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Groningen is de methode sinds 1 juni 1958 in gebruik. Er werden sindsdien enkele duizenden bepalingen uitgevoerd; de ervaringen waren onverdeeld gunstig.

-----